

REC'D 14 SEP 2004

PCT

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 :

Application Number

10-2004-0044881

출원년월일 :

Date of Application

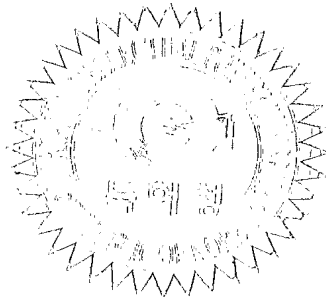
2004년 06월 17일
JUN 17, 2004

출원인 :

Applicant(s)

한국과학기술원

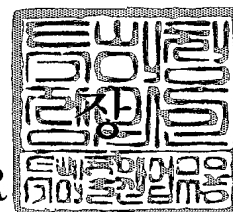
Korea Advanced Institute of Science and Techno



2004 년 08 월 30 일

특허청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.06.17
【발명의 명칭】	대장균의 외막 단백질을 이용한 목적 단백질의 미생물 표면발현 방법
【발명의 영문명칭】	Method for Cell Surface Display of Target Proteins Using FadL of E. coli
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2003-015686-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상엽
【성명의 영문표기】	LEE, SANG YUP
【주민등록번호】	640412-1025515
【우편번호】	305-390
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이승환
【성명의 영문표기】	LEE, SEUNG HWAN
【주민등록번호】	751201-1675525
【우편번호】	305-701
【주소】	대전광역시 유성구 구성동 373-1
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박시재
【성명의 영문표기】	PARK, SI JAE
【주민등록번호】	750202-1017714

【우편번호】 302-740
【주소】 대전광역시 서구 만년동 초원아파트 108-1203
【국적】 KR
【공지예외적용대상증명서류의 내용】
【공개형태】 학술단체 서면발표
【공개일자】 2004.04.16
【심사청구】 청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 4
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이처영 (인)
【수수료】
【기본출원료】 0 면 38,000 원
【가산출원료】 32 면 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 19 항 717,000 원
【합계】 755,000 원
【감면사유】 정부출연연구기관
【감면후 수수료】 377,500 원
【첨부서류】 1. 공지예외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받기 위한 증명서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 대장균에서 유래한 세포 외막 단백질 (FadL)을 세포표면 발현모체로 사용하여 목적단백질이나 펩타이드를 세포표면에 효율적으로 발현시킬 수 있는 발현벡터, 상기 발현벡터로 형질전환된 미생물, 상기 형질전환 미생물을 배양하여 목적 단백질을 세포표면에 안정적으로 다량 발현시키는 방법 및 상기 표면발현된 목적 단백질을 이용하는 것을 특징으로 하는 단백질 어레이의 제조방법, 항체의 제조방법, 생물전환방법 및 목적단백질의 개량방법에 관한 것이다.

본 발명에 의하면, 세포 외막에 목적단백질을 정상적인 기능을 가진 상태로 발현시킬 수 있으므로, 삽입되는 목적유전자에 따라, 재조합 생백신, 여러 펩타이드나 항체의 선별, 중금속 제거 또는 폐수처리에 응용할 수 있는 전세포 흡착제, 전세포 생물전환 등에 유용하게 사용할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

세포외막 단백질, 표면발현, FadL, 개량, 단백질 어레이, 항체, 생물전환

【명세서】

【발명의 명칭】

대장균의 외막 단백질을 이용한 목적 단백질의 미생물 표면발현 방법 {Method for Cell Surface Display of Target Proteins Using FadL of E. coli}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 따른 재조합 플라스미드 pTacFadL 및 p104FadL를 나타낸 것이다.

도 2는 세포표면에 발현된 리파제에 대한 confocal microscopy 사진을 나타낸 것이다.

도 3은 세포표면에 발현된 리파제의 활성을 입증하기 위한 플레이트 사진을 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<4> 발명의 분야

<5> 본 발명은 그람음성 세균인 대장균(*Escherichia coli*)에서 유래한 세포외막 단백질 FadL을 이용하여, 목적 단백질을 세포표면에 안정적으로 다량 발현시키는 방법 및 표면발현된 목적 단백질을 이용하는 것을 특징으로 하는 단백질 어레이의 제조방법, 항체의 제조방법, 생물전환방법 및 목적단백질의 개량방법에 관한 것이다.

<6> 발명의 배경

<7> 세포 표면발현은 단백질이나 펩타이드 등을 적절한 표면발현 모체(anchoring motif)와 융합시켜서 그램 음성, 양성균, 곰팡이, 효모, 동물세포의 표면에 발현시키는 기술을 말한다 (Lee S. Y., *et al.*, Trends Biotechnol., 21:4552, 2003). 최초의 세포 표면발현 기술은 1980년대 상대적으로 표면이 단순한 파이지를 이용하여 펩타이드나 작은 단백질을 필라멘터스 파이지(filamentous phage)의 pIII와 융합하여 발현시켜 이를 표면발현 시스템(surface-expression system)이라고 하였다. 파이지를 이용한 세포 표면발현은 항체의 스크리닝이나, epitope, high-affinity ligand 등의 스크리닝에 사용되었으나, 파이지의 표면에 발현될 수 있는 단백질의 크기가 상대적으로 제한되어 있어서 한계점을 드러내게 되었다. 따라서, 그 대안으로 박테리아를 이용한 세포 표면발현이 개발되었다. 박테리아나 효모와 같은 미생물의 표면 단백질을 표면발현 모체(surface anchoring motif)로 사용하여 외래 단백질을 미생물 표면에 안정적으로 발현시키는 분야이다.

<8> 특정 유기체의 외막단백질을 이용하여 외래단백질을 세포표면에 발현시키기 위해서는 적당한 표면단백질과 외래단백질을 유전자 수준에서 서로 연결하여 융합단백질이 생합성되도록 하고, 이들이 안정하게 세포내막을 통과하여 세포표면에 부착되어 유지되도록 해야 한다. 이를 위해서는 다음과 같은 성질을 갖는 단백질을

표면발현의 모체로 사용하는 것이 바람직하다: 첫째, 세포내막을 통과할 수 있는 분비신호 (secretion signal)를 N-말단에 가지고 있고, 둘째, 세포 외막 표면에 안정적으로 부착될 수 있는 표적신호(targeting signal)를 가져야 하며, 셋째, 세포의 성장에 악영향을 끼치지 않는 범위 내에서 세포표면에 다량으로 발현되어 단백질의 활성이 높게 나타날 수 있으면서, 마지막으로, 단백질의 크기에 관계없이 안정적으로 발현되어 다양한 반응에 이용될 수 있어야 한다 (Georgiou *et al.*, TIBTECH, 11:6, 1993). 이러한 표면발현 모체는 숙주세포의 표면에 외막단백질의 N-말단이나 C-말단, 또는 단백질의 중앙에 삽입되도록 유전적으로 조작할 필요도 있다 (Lee *et al.*, TIBTECH, 21:45, 2003)

<9> 복잡한 막구조를 가지고 있는 대장균과 같은 박테리아에서 세포 표면발현을 성공적으로 수행하기 위해서는 우선 세포 표면에 발현시키고자 하는 외래 단백질을 세포 표면까지 안정적이며 효율적으로 이동시킬 수 있는 표면발현 모체의 사용이 요구되는데, 지금까지 대장균에서 사용된 표면발현 모체는 외막 단백질, lipoprotein, autotransporters, surface appendages의 subunits과 S-layer 단백질 등이 있다. 그중에서 세포외막 단백질의 경우 그 3차원적인 구조가 세포외막을 통과하는 루프 구조를 가지고 있으므로, 다양한 단백질을 발현할 수 있는 fusion site를 제공할 수 있는 장점으로 인하여 표면발현 모체로 많이 사용되었다.

<10> 그 중 OmpA, OmpS, LamB, OprF, PhoE 등과 같은 세포 외막 단백질의 경우 상대적으로 분자량이 작은 peptides, antibodies, domains, receptors 등의 발현에 사용되었다 (Agterberg, M.,

et al., Gene, 88:37, 1990; Lang, H., *et al.*, Eur. J. Bacteriol., 267:163, 2000). 삽입된 외래 단백질의 C-말단과 N-말단이 입체적으로 가깝게 위치해야 하므로, 단백질이 큰 경우에는 단백질의 안정성이 낮아진다. 실제로 LamB 또는 PhoE의 경우 50 내지 60개 이상의 아미노산으로 이루어진 외래 단백질을 삽입하면, 구조적 제한을 가져와 안정한 막단백질을 형성하지 못하고, 대장균의 포린(porin) 세포 외막 단백질을 사용하는 경우, 최고 150개의 아미노산으로 구성된 단백질이 아닌 에피토프(epitope)나 금속결합 모티프(metal binding motif) 등에 국한되어 사용되었다 (Stahl., S., *et al.*, Trends Biotechnol., 15:185, 1997; Kjaergaard, K., *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 66:10, 2000).

<11> 박테리아의 분비 시스템을 응용한 세포 표면발현의 응용 범위는 매우 넓다. 표면에 발현되는 단백질이나 펩타이드 등에 따라 다양한 용도로 사용될 수 있다. 특정 단백질을 표면에 발현하여 펩타이드나 항체, receptor 등의 스크리닝을 간단하게 수행할 수 있고 (Francisco, J. A. R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. USA., 91:10444, 1993), 항원 epitope를 세포표면에 발현시켜서 강력한 면역반응을 나타낼 수 있는 생 백신(live vaccine) 생성할 수 있다. 또한 정밀화학, 농약, 의약 등에서 요구되는 특정효소를 세포표면에 발현하여 전세포 생축매의 용도로 사용하거나, 오염물질을 분해하거나, 금속 이온을 흡착할 수 있는 단백질을 발현하여 bioremediation에 사용할 수 있다 (Charbit, A., *et al.*, Gene., 70:181, 1988; Sousa, C., *et al.*, J. Bacteriol., 180:2280, 1998; Richins, R., *et al.*, Nat. Biotechnol., 15: 984, 1997).

<12> 현재까지 다양한 종류의 세포표면발현 모체가 보고되어있다. 그러나, 한 세포표면발현 모체로 표면발현시킬 수 있는 대상은 제한되어 다양한 단백질을 세포표면에 발현시키기 위해서는 서로 다른 세포표면 발현모체를 개발하는 것이 필요하다고 할 수 있다.

- <13> 대장균의 FadL은 대장균의 지방산 대사와 관련된 단백질로서, 지방산의 수송에 관여하는 단백질이다. FadL 단백질의 세포막 토폴로지(membrane topology)를 보면, 단백질의 N-말단과 C-말단이 주변 세포질에 존재하며 10개의 루프(loop)가 세포외막 바깥쪽으로 나와 있으며, 9개의 루프가 주변세포질 쪽으로 나와 있다 (Cristalli, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 377: 324, 2000).
- <14> FadL의 경우 대장균자체 단백질이므로 대장균을 host로 하여 외래단백질을 융합 발현시에 용이하고, 10개의 external loop를 가지고 있어서, 여러 fusion 가능한 point를 제공하여, 표면발현 가능성을 높일 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 여러 세포표면 발현시스템에서 세포표면에 발현된 효소의 단점이라 지적되어온 안정성을 가지고 있다. 즉, 세포표면에 발현된 효소가 여러 조건(고온, 높은 pH, 유기용매 등)에서 오랜 시간동안 활성을 유지하는 장점을 가지고 있다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <15> 이에, 본 발명자들은 대장균의 세포외막 단백질 FadL의 세포외막 바깥쪽으로 나와 있는 10개의 루프 중 가장 발현 가능성이 클 것으로 예상되는 9번째 루프 이후의 유전자를 제거하고, 여기에 외래 단백질(리포제)을 융합발현시킨 다음, 상기 세포표면에 발현된 리포제가 생물전환반응에 유용하다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- <16> 본 발명의 목적은 대장균 세포외막 단백질 (FadL)을 코딩하는 fadL 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 목적단백질의 표면발현백터를 제공하는데 있다.

- <17> 본 발명의 다른 목적은 상기 표면발현백터로 형질전환된 미생물 및 상기 형질전환된 미생물을 배양하는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 세포표면 발현방법을 제공하는데 있다.
- <18> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 의해 제조되고 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 단백질 어레이의 제조방법, 척추동물에서 항체를 생산하는 방법 및 생물전환 방법을 제공하는데 있다.

【발명의 구성】

- <19> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대장균 세포외막 단백질 (FadL)을 코딩하는 fadL 유전자, 항생제 내성유전자, 프로모터 및 목적단백질을 코딩하는 유전자를 포함하고, 상기 목적단백질을 코딩하는 유전자가 숙주세포 내에서 발현될 경우, FadL에 융합되어 세포 표면에 발현이 가능하도록 이루어진 유전자 재조합체를 함유하는 목적단백질의 표면발현백터를 제공한다.
- <20> 본 발명에 있어서, 상기 목적단백질의 표면발현백터는 fadL 유전자의 중간부위에 링커가 삽입되어 있고, 상기 삽입된 링커에 목적단백질을 코딩하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 fadL 유전자의 C-말단이 제거되고, 상기 제거된 C-말단 위치에 목적단백질을 코딩하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있으며, fadL 유전자의 9번째 루프 이후의 염기서열이 제거되고, 상기 제거된 위치에 목적단백질을 코딩하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- <21> 본 발명에 있어서, 상기 목적단백질은 표면발현에 유리하도록 목적단백질의 아미노산 서열 중 일부분이 제거되거나 위치 특이적으로 돌연변이된 것임을 특징으로 할 수 있다. 상기 프

로모터는 tac 프로모터 또는 gntT104 프로모터인 것을 특징으로 할 수 있으나, 목적단백질은 숙주세포에서 발현이 유도될 수 있는 적절한 프로모터에 의해 발현되거나, 목적단백질 유전자의 프로모터에 의해 발현되거나 또는 숙주 박테리아에서 발현가능한 적절한 다른 프로모터에 의해 발현될 수 있음은 당업자에게 자명한 것이다.

<22> 본 발명은 또한, 상기 표면발현백터로 형질전환된 미생물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 형질전환에 사용된 미생물은 목적단백질의 표면발현에 유리하도록, 발현된 목적단백질을 분해하는데 관련된 세포 내 또는 세포 외의 단백질 분해효소를 생산하지 못하도록 변형된 것임을 특징으로 할 수 있고, 상기 미생물은 박테리아인 것을 특징으로 할 수 있다.

<23> 본 발명은 또한, 상기 형질전환된 미생물을 배양하여 목적단백질을 세포표면에 발현하는 단계 및 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 발현방법을 제공한다.

<24> 본 발명에 있어서, 목적 단백질은 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소저해제, 신호전달 단백질 혹은 그 일부분, 항체 혹은 그 일부분, 단쇄항체, 결합단백질, 결합도메인, 펩타이드, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절 인자, 혈액응고 인자 및 식물 생체방어 유도 단백질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

- <25> 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조되고, 효소활성을 갖는 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 생물전환 방법을 제공한다. 생물전환반응의 촉매물질로는 효소, 촉매항체 등 화학반응을 촉매할 수 있는 어떠한 물질도 FadL 단백질과 융합발현시켜 사용할 수 있다.
- <26> 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조되고, 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 기질 표면에 고정화시키는 것을 특징으로 하는 단백질 어레이의 제조방법을 제공한다.
- <27> 단백질 어레이는 DNA 어레이 또는 DNA 칩과 같이 다양한 단백질, 특히 항체들을 고체 표면에 어레이하여 특정 세포에서의 원하는 목적단백질의 발현여부, 발현정도 등을 분석할 수 있는 수단을 제공한다. 단백질 어레이를 제조하기 위해서는 어레이할 단백질을 확보하고, 고체 표면에 단백질을 고정화해야 한다. 단백질 어레이를 이용한 분석과정에서는 고정화된 단백질과 결합시키고 결합하지 않는 단백질들을 세척시키기 위하여, 고온, 염농도 및 pH의 변화 등 다양한 처리가 이루어지고, 이에 이러한 악환경에서 견딜 수 있는 안정화된 단백질의 고정화가 필요하다. 그러나 많게는 수 천 내지 수 만개의 단백질 유전자를 발현벡터에 클로닝하고, 발현하여 분리한 다음, 이를 고체 표면에 고정화하는 일은 매우 많은 작업이 반복적으로 이루어져야 한다. 따라서, 상기 작업을 보다 단순하고 신속하게 할 필요가 있다.
- <28> 본 발명의 단백질 어레이의 제조방법은 상기한 작업을 가장 용이하게 할 수 있는 수단을 제공한다. 본 발명의 단백질 어레이의 제조과정에는 통상적으로 당업계에서 이용되는 제조방법이 적용될 수 있다 (WO 00/61806; WO 00/54046; US 5,807,754; EP 0818467; WO 97/42507; US 5,114,674 및 WO 96/35953). 본 발명의 방법에 의해 제조된 단백질 어레이는 진단용 키트, 유전자 발현분석, 단백질과 단백질간 또는 단백질과 리간드간 및 항원과 항체간의 상호반응

분석, 대사과정 분석, 신규 효소 탐색 또는 개량된 효소의 탐색, 조합 생화학합성 및 바이오센서 등에 이용될 수 있다.

<29> 본 발명에서 이용될 수 있는 고체 기판은 유리(예: 작용기가 노출된 유리), Si, Ge, GaAs, GaP, SiO, SiN₄, 변형된 실리콘 니트로셀룰로오스, 폴리비닐리덴 플루오리드, 폴리스틸렌, 폴리테트라플루오로에틸렌, 폴리카보네이트, 나일론, 섬유 또는 이의 조합이다. 상기한 기판에는 단백질의 고정화를 위하여 링커 분자가 부착되기도 하고, 스팟팅이 되지 않은 나머지 부분은 블로킹되는 것이 바람직하다. 한편, 각각의 스팟(또는 어드레스)에 적용되는 본 발명의 표면발현된 세포의 양은 어레이 형태에 따라 결정된다. 고체 기판에 고정화된 본 발명의 표면발현된 단백질과 시료의 상호작용은 단백질의 고유 특성(예: 면역반응성)을 이용하여 검출할 수도 있고, 또는 표면발현된 단백질에 적합한 표식물질(예: 형광물질, 발광물질, 방사능 물질, 에피토프)을 결합시켜 표식물질의 신호변화를 검출할 수도 있다. 본 발명의 단백질 어레이에 의한 최종적인 결과의 분석은 당업계에서 "스캐너" 또는 "리더"로 공지되어 있는 자동화된 장치를 이용하여 실시할 수 있다.

<30> 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조되고, 항원이 표면에 발현된 세포를 인간을 제외한 척추동물에 투여하여 면역반응을 유도하고, 상기 면역반응에 의해 생성된 항체를 회수하는 것을 특징으로 척추동물에서 항체를 제조하는 방법을 제공한다.

<31> 본 발명에 따른 표면발현기술은 항원 또는 그 일부분을 세포 표면에 발현하여 항체를 생성하게 함으로써 이를 이용한 재조합 생백신의 전달 수단을 제공하게 된다. 현재까지의 백신은 약독화된 병원성 세균이나 바이러스를 주로 사용하였고, 박테리아의 경우에는 항원을 세포내, 세포막 또는 세포외로 분비 발현하여 숙주세포에 전달하였다. 표면발현된 생백신은 매우 강력

한 면역반응을 나타내고 숙주세포 내에 증식하면서 지속적으로 항원을 발현할 수 있기 때문에, 새로운 백신 전달수단으로서 주목을 받고 있다. 특히 비병원성 대장균이나 살모넬라균의 표면에 병원성 유래의 항원 에피토프를 발현하여 살아있는 상태로 경구 투여할 경우에는 훨씬 지속적이고 강력한 면역반응을 나타내는 것으로 알려져 있어서 항원-항체 생성을 유도하는 방법으로 사용될 수 있다 (Georgiou, *et al.*, Nature Biotechnol., 15:29-34, 1997; Lee, *et al.*, Nature Biotechnol., 18:645-8, 2000).

<32> Martineau 등은 대장균의 표면발현기술을 이용하여 항펩타이드 항체를 생산하는 매우 간단한 방법을 보고하였다(Martineau, *et al.*, Bio/Technol., 9:170-2, 1991). 그 내용을 살펴보면, MalE와 세포외막 단백질인 LamB의 표면돌출부위에 원하는 펩타이드를 발현한 다음, 전세포 또는 분쇄된 세포를 동물에 투여하여 항펩타이드 항체의 생성을 유도하였고, 이러한 방법에 따르는 경우에는 화학적으로 펩타이드를 합성하거나 이를 전달 단백질에 부착하지 않고도 항체를 생산할 수 있게 된다.

<33> 본 발명의 항체 생성방법에 이용되는 항원이 표면에 발현된 세포는 투여대상에 안전한 세포인 것이 바람직하며, 또한, 불완전 프로이드 아쥬방 및 완전 프로이드 아쥬방과 같은 아쥬방을 포함하는 것이 바람직하다. 한편, 투여하는 단계는 주사 투여가 바람직하고, 정맥내 투여, 복강내 투여, 피하 투여 및 근육내 투여가 보다 바람직하다. 한편, 충분한 양의 항체를 수득하기 위해서는 투여는 1차 투여후 적합한 시기내에 부스터 투여를 하는 것이 바람직하다.

<34> 본 발명은 또한, 리파제를 이용하여 라세미 에스터 화합물로부터 키랄성 에스터, 키랄성 유기산 또는 키랄성 알코올로 광학분할하는 키랄 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 방법에 의해 제조된 세포표면에 발현된 리파제를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

<35> 본 발명은 또한, (a) 목적단백질을 코딩하는 유전자의 변이체 라이브러리를 구축하는 단계; (b) 상기 목적단백질의 변이체가 FadL 단백질과 융합된 상태로 발현되도록 목적단백질의 유전자 변이체 라이브러리와 *fadL* 유전자를 함유하는 유전자 재조합체를 제작하는 단계; (c) 상기 유전자 재조합체 또는 상기 유전자 재조합체를 포함하는 벡터로 그람음성균, 그람양성균, 방선균, 효모 및 곰팡이로 구성된 그룹으로부터 선택되는 숙주세포를 형질전환하는 단계; (d) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기 유전자 변이체 라이브러리를 세포표면에 발현하는 단계; 및 (e) 개량된 형질을 갖는 목적단백질이 발현된 세포를 스크리닝하는 단계를 포함하는 목적단백질의 개량방법을 제공한다.

<36> 본 발명의 목적단백질 개량방법에 있어서, 유전자 라이브러리를 구축하는 단계는 DNA 서플링법 (Stemmer, Nature, 370:389-91, 1994), StEP법 (Zhao, H., *et al.*, Nat. Biotechnol., 16: 258-61, 1998), RPR법 (Shao, Z., *et al.*, Nucleic Acids Res., 26:681-3, 1998), 분자육종법 (Ness, J.E., *et al.*, Nat. Biotechnol. 17:893-6, 1999), ITCHY법 (Lutz S., *et al.*, Cur. Opi. Biotechnol., 11:319-24, 2000), 에러 유발(error-prone) PCR (Cadwell, R.C., *et al.*, PCR Methods Appl., 2:28-33, 1992), 포인트 돌연변이법 (Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)을 이용하여 야생형 목적단백질의 유전자를 변이시킴으로써 얻을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<37> 본 발명의 목적단백질의 개량방법에 있어서, 상기 스크리닝 단계는 목적단백질의 활성, 목적단백질에 라벨링된 물질을 인식하는 단백질, 목적단백질에 결합하는 라벨링된 리간드 또는 목적단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 상기 스크리닝 단계는 유세포 분석기 (Georgiou, G., Adv Protein Chem., 55:293-315, 2000)를 이용하

여 실시할 수도 있고, 단백질의 활성을 이용하는 경우에는 단백질이 발현되는 숙주의 성장을 측정하거나, 또는 단백질에 의해 촉매되는 발색반응을 측정하여 스크리닝할 수 있다.

<38> 상술한 바와 같은 특징을 갖는 본 발명의 단백질 개량방법을 이용할 경우, 종래의 방법으로서는 용이하게 얻을 수 없는, 생물학적으로 발생하지 않는 화학반응을 촉매하는 효소(예: Diels-Alder 축합반응), 비자연적인 입체 선택성 또는 레지오선택성(regioselectivity)을 갖는 효소, 유기용매 또는 유기용매-수용액 이상의 용액에서 반응을 촉매할 수 있는 효소, 그리고 고온 고압과 같은 극한 조건에서 반응을 촉매하는 효소 등을 야생형 효소로부터 신속하게 얻을 수 있다.

<39> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다

<40> 특히, 하기 실시예에서는 리파제를 이용한 생물전환반응이 예시되어 있으나, 본 발명의 방법은 베타갈락토시다아제, 프로테아제, 셀룰라제, 당전이효소, 산화환원효소 및 알돌라아제 등 세포표면에 발현된 어떠한 효소도 이용할 수 있으며, 생물전환 반응이 단일 단계 또는 다단계인 경우에도 적용되며, 생물전환 반응이 수용액상 또는 비수용액상에서 일어나는 경우에도 적용되고, 효소가 표면에 발현된 세포는 고정 또는 비고정화된 상태에서 이용될 수 있으며, 생물전환이 다른 미생물 또는 효소와 혼합하여 사용할 수 있다는 것은 본 명세서에 개시된 내용으로부터 당업자에게 자명하다.

<41> 실시예 1: 재조합 벡터 pTrcFadL의 제조

<42> Trc 프로모터 상에서의 세포 외막 단백질을 발현시키기 위하여 trc 프로모터를 가진 재조합 플라스미드 pTrcFadL를 제조하였다.

<43> C-말단이 제거된 대장균의 세포 외막 단백질 (FadL) 유전자를 확보하기 위하여, 대장균 W3110(ATCC 39936) 염색체(chromosomal DNA)를 주형으로 하고, 서열번호 1과 2의 프라이머를 사용하여 PCR(첫번째 변성 95℃ 5분, 두번째 변성 95℃ 30초, 교잡 50℃ 1분, 연장 72℃ 1분 30초, 30회 반복)을 수행하였다.

<44> 서열번호 1: 5-ggaattcatggtcatgagccagaaaacc

<45> 서열번호 2: 5-gctctagaacgattctgtgcaggaac

<46> 아가로스 겔 전기영동법으로 상기 PCR에 의해 수득한 절편에서 약 1100bp 크기의 DNA 절편을 분리하고, 제한효소 EcoRI과 XbaI으로 절단하였다. 이를, trc 프로모터를 갖고 있는 플라스미드 pTrc99A(Pharmacia Biotech., Uppsala, Swede)를 제한효소 EcoRI과 XbaI으로 절단하여 수득한 DNA 절편과 연결시켜 재조합 플라스미드를 수득하고, 일렉트로포레이션(electroporation) 방법으로 대장균 XL10-Gold에 도입하여 형질전환시킨 다음, 앰피실린(50 µg/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하고, 이로부터 pTrcFadL 재조합 플라스미드를 수득하였다(도 1).

<47> 실시예 2: 재조합 벡터 p104FadL의 제조

<48> Constitutive 프로모터 상에서의 세포 외막 단백질을 발현시키기 위하여, gntT104 프로모터를 가지는 재조합 플라스미드 p104FadL를 제조하였다. 즉, gntT104 프로모터를 가지고 있는 플라스미드 p10499a (Park, S.J., *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 214:217, 2002)를 제한 효소 EcoRI과 XbaI으로 절단한 DNA 단편과, 위에서 얻은 C-말단이 제거된 대장균 외막 단백질 FadL 유전자를 연결하여, 재조합 플라스미드를 제작하고, 일렉트로포레이션 방법을 이용하여 대장균 XL10-Gold(Stratagene Co.)에 도입하여 형질전환시켰다. 형질전환된 균주는 앰피실린 (50 µg/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하고, 이로부터 p104FadL 재조합 플라스미드를 수득하였다 (도 1).

<49> 실시예 3: 재조합 발현백터 pTrcFadLPL 및 p104FadLPL 의 제조

<50> 리파제를 세포표면에 발현하는 재조합 플라스미드를 제조하기 위하여 우선 슈도모나스 플루레센스(*Pseudomonas fluorescens*)가 가지고 있는 리파제 유전자를 다음과 같이 작제하였다. 즉, 슈도모나스 플루레센스의 염색체(chromosomal DNA)를 주형으로 하고, 서열번호 3과 4의 프라이머를 사용하여, PCR(첫번째 변성 95℃ 5분, 두번째 변성 95℃ 45초, 교잡 60℃ 45초, 연장 72℃ 1분 30초, 30회 반복)을 수행하였다

<51> 서열번호 3: 5-gctctagaatgggtgtatTTGactacaagaac

<52> 서열번호 4: 5-cccaagctttcaactgatcagcacacc

<53> 아가로스 젤 전기영동법을 이용하여, 상기 PCR에 의해 얻어진 DNA 절편으로 부터 약 1.4kbp 크기의 DNA 절편인 리파제 유전자를 수득하였다. 전기 리파제 유전자를 XbaI과 HindIII

으로 절단하고, pTrcFadL과 p104FadL에 삽입시켜서, 재조합 발현벡터 pTrcFadLPL과 p104FadLPL을 각각 제조하고, 일렉트로포레이션 방법을 이용하여 대장균 XL10-Gold에 도입하여 형질전환시켰다. 형질전환된 균주는 앰피실린($50 \mu\text{g/L}$)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 선별된 균주는 LB 액체배지에서 배양하여 -80°C 냉동고에 보관하였다 (도 1).

<54> 실시예 4: 리파제의 세포표면발현

<55> 실시예 3에서 제조된 형질전환체 XL10-Gold (pTrcFadLPL)을 앰피실린($50 \mu\text{g/L}$)이 첨가된 10mL의 LB 액체배지에 접종하여 37°C 에서 배양하였다. 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 흡광도가 0.5일 때 0.1 mM IPTG를 첨가하여 유전자 발현을 유도하였다. 발현유도 5시간 경과 후, 4°C , 6000rpm에서 5분 동안 배양액을 원심분리 하여 세포를 수득하고, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.2) 용액으로 세척한 후, 3 wt% bovine serum albumin(BSA)이 포함된 PBS용액에 재현탁하였다. 3 wt% BSA가 첨가된 PBS용액에 1:1000의 비율로 1차 항체인 rat anti-lipase serum을 첨가한 후, 4°C 에서 4시간 배양하였다. PBS용액으로 5번 세척한 후, Texas Red가 conjugate된 2차 항체 goat anti-rat IgG를 1:3000의 비율로 첨가해준 후, 4°C 에서 12시간 배양하였다. 반응하지 않은 2차 항체를 제거하기 위하여, PBS용액으로 5번 세척한 후, Confocal 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 관찰하여, 리파제가 세포표면에 발현된 것을 확인하였다 (도 2)

<56> 실시예 5: 세포표면에 발현된 리파제의 활성

<57> 실시예 3에서 제조된 형질전환체 XL10-Gold (p104FadLPL)을 앰피실린($50 \mu\text{g/L}$)과 트리뷰티린(1% v/v)이 첨가된 LB 평판배지에서 배양하였다. 72시간 경과 후, 리파제 활성으로 인하여 배지에 halo가 생성되었다 (도 3)

<58> 실시예 6: 세포표면에 발현된 리파제를 이용한 라세미 만델산 메틸 에스터의 광학분할

<59> 실시예 3에서 제조된 형질전환체 XL10-Gold (pTrcFadLPL) 앰피실린($50 \mu\text{g/L}$)이 첨가된 100mL의 LB 액체배지가 담긴 250mL 삼각플라스크에 다시 접종하여 37°C 에서 배양하였다. 분광광도계로 600nm 파장에서 측정한 흡광도가 0.5일 때 0.1mM IPTG를 첨가하여 유전자 발현을 유도하였다. 발현유도 5시간 경과 후, 4°C , 6000rpm에서 5분동안 배양액을 원심분리하여 세포를 수득하고, 세포를 50mM Tris-HCl 용액(pH 8.0)으로 세척하였으며, 3mL의 상기 완충용액으로 재현탁한 다음, 10mL 플라스크에 넣고 30mg의 라세미 만델산 메틸 에스터를 첨가하고, 48시간동안 교반하며 반응시켰다. 이어, 4°C , 6000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 제거하고, 상등액을 수득한 다음, pH를 3.0으로 조절하였다. 10mL의 에틸 아세테이트와 헥산으로 추출한 후, 액체크로마토그래피로 분석하였다. 그 결과, (S)-만델산과 (R)-만델산 메틸 에스터가 얻어졌다.

<60> 분석 조건:

<61> 칼럼: Chiralcel OD-H

<62> 유속: 0.5 mL/min

<63> solvent Hexane: iso-propanol: tri-fluoroacetic acid = 90: 10: 0.1 (volume ratio)

<64> Detect: UV 254nm

- <65> 실시예 7: 세포표면에 발현된 리파제를 이용한 라세미 베타-락탐, 라세미 시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온의 광학분할
- <66> 실시예 6과 동일한 방법으로 세포를 수득하고, 3mL의 0.1M 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 현탁시킨 다음, 20mg의 라세미 베타-락탐, 라세미 시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온(racemic cis-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-one)을 첨가하고, 24시간 동안 교반하며 반응시켰다. 이때, 반응시료를 박막크로마토그래피(TLC)에 적용하여(클로로포름:에틸아세테이트:헥산=3:2:3(v:v:v)) 반응의 진행도를 확인하였다.
- <67> 반응 후, 6000rpm에서 7분 동안 원심분리하여 세포를 제거하고, 상등액을 수득하여, 10mL의 에틸아세테이트로 5번 추출하고, 진공 회전식 증류농축기를 이용하여 용매를 제거한 다음, 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 통하여 키랄성 베타-락탐, 8mg의 (-)-시스-3-하이드록시-4-페닐아제티딘-2-온((-)-cis-3-hydroxy-4-phenylazetidin-2-one) (수율 40%)과 6mg의 (-)-시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온((-)-cis-3-acetoxy-4-phenylazetidin-2-one) (수율 30%)을 수득하였다.
- <68> (-)-시스-3-하이드록시-4-페닐아제티딘-2-온
- <69> $[\alpha]_D^{20} -130^\circ (c\ 0.5, CH_3OH)$;
- <70> $^1H\ NMR\ (CDCl_3\ \&\ DMSO-d_6)\ \delta\ 3.60(s, 1\ H, OH), 4.95(d, J = 4.7\ Hz, 1\ H, C3\ H), 5.88(d, J = 4.7\ Hz, 1\ H, C4\ H), 6.22(s, 1\ H, NH), 7.27-7.40(m, 5\ H, ArH)$;
- <71> $^{13}C\ NMR(CDCl_3\ \&\ DMSO-d_6)\ \delta\ 58.6, 79.1, 127.6, 128.1, 137.1, 170.5$;
- <72> CIMS, $m/z\ 163(M^+), 91(base)$.

<73> (-)-시스-3-아세톡시-4-페닐아제티딘-2-온

<74> $[\alpha]_D^{30}$ (c 1, CHCl_3);

<75> IR (KBr) 3200, 1750, 1720 cm^{-1}

<76> ^1H NMR(CDCl_3) δ 1.68(s, 3 H, CH_3CO), 5.05(d, $J = 4.5$ Hz, 1 H, C3 H), 5.88(dd, $J = 2.6$ & 4.5 Hz, 1 H, C4 H), 6.25(s, 1 H, NH), 7.29-7.39(m, 5 H, Ar);

<77> ^{13}C NMR(CDCl_3) δ 19.7, 57.9, 78.3, 127.5, 127.7, 128.2, 128.5, 134.7, 165.6(β -lactam CO), 169.0(acetoxy CO);

<78> CIMS, m/z 205(M^+), 106(base).

<79> 실시예 8: 세포표면에 발현된 리파제의 pH에 대한 안정성

<80> 실시예 6과 동일한 방법으로 세포를 수득하고, 3mL의 Tris-HCl 완충용액(pH 10.0)에 현탁한 후, 시간별로 100 μL 씩 취하여, 활성을 측정하였다. 그 결과, 48시간이 지난 이후에도 초기 활성의 90%이상이 유지되었다. 활성 측정법은 다음과 같다. 채취한 시료를 원심분리(4°C, 6000rpm, 5분)하여 세포를 수득한 다음, p-nitrophenyl decanoate를 acetonitrile에 10mM의 농도로 녹인 용액과 에탄올과 pH 8.0 Tris-HCl 완충용액을 1: 4: 95의 비율(volume ratio)로 섞어서 만든 용액에 현탁하여 37°C에서 10분동안 반응시킨 다음, 2 μL 의 0.5M EDTA 용액을 넣어 반응을 종결시킨 후, 405nm에서 흡광도를 측정하여 활성을 계산한다.

<81> 실시예 9: 세포표면에 발현된 리파제의 온도에 대한 안정성

- <82> 실시예 6과 동일한 방법으로 세포를 수득한 후, 3mL의 pH 8.0의 Tris-HCl에 현탁한 다음, 50℃에 방치한 후, 실시예 8과 같이 활성을 측정하였다. 그 결과, 120시간이 지난 이후에도 초기 활성의 90%이상이 유지되었다.
- <83> 실시예 10: 세포표면에 발현된 리파제의 유기용매에 대한 안정성
- <84> 실시예 6과 동일한 방법으로 세포를 수득하고, 3mL의 헥산에 현탁한 다음 37℃에 방치한 다음 실시예 8과 같이 활성을 측정하였다. 그 결과, 48시간 동안 활성을 유지 하였다.
- <85> 상기 실시예 6 및 10에서 확인된 바와 같이, 세포표면에 정상적으로 발현된 리파제는 키랄 화합물의 제조에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 회수가 용이하고 안정성이 우수하여, 키랄 화합물의 제조공정을 단순화시킬 수 있고, 키랄 화합물 제조공정의 생산성을 증대시키는 것이 가능하다.
- <86> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

- <87> 본 발명은 대장균에서 유래한 세포 외막 단백질 (FadL)을 세포표면 발현모체로 사용하여 목적단백질이나 펩타이드를 세포 표면에 효율적으로 발현시킬 수 있는 발현백터, 상기 발현백터로 형질전환된 미생물 및 상기 형질전환 미생물을 배양하여 목적 단백질을 세포표면에 안정적으로 다량 발현시키는 방법을 제공하는 효과가 있다.
- <88> 본 발명은 또한, 상기 표면발현된 목적 단백질을 이용하는 것을 특징으로 하는 단백질 어레이의 제조방법, 항체의 제조방법, 생물전환방법 및 목적단백질의 개량방법을 제공하는 효과가 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

대장균 세포외막 단백질 (FadL)을 코딩하는 fadL 유전자, 항생제 내성유전자, 프로모터 및 목적단백질을 코딩하는 유전자를 포함하고, 상기 목적단백질을 코딩하는 유전자가 숙주세포 내에서 발현될 경우, FadL에 융합되어 세포 표면에 발현이 가능하도록 이루어진 유전자 재조합체를 함유하는 목적단백질의 표면발현백터.

【청구항 2】

제1항에 있어서, fadL 유전자의 중간부위에 링커가 삽입되어 있고, 상기 삽입된 링커에 목적단백질을 코딩하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현백터.

【청구항 3】

제1항에 있어서, fadL 유전자의 C-말단이 제거되고, 상기 제거된 C-말단 위치에 목적단백질을 코딩하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현백터.

【청구항 4】

제1항에 있어서, fadL 유전자의 9번째 루프 이후의 염기서열이 제거되고, 상기 제거된 위치에 목적단백질을 코딩하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면

발현백터.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 목적단백질은 표면발현에 유리하도록 목적단백질의 아미노산 서열 중 일부분이 제거되거나 위치 특이적으로 돌연변이된 것임을 특징으로 하는 목적단백질의 표면 발현백터.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 tac 프로모터 또는 gntT104 프로모터인 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현백터.

【청구항 7】

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 표면발현백터로 형질전환된 미생물.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 형질전환에 사용된 미생물은 목적단백질의 세포 표면발현에 유리하도록, 발현된 목적단백질을 분해하는데 관련된 세포 내 또는 세포 외의 단백질 분해효소를 생산하지 못하도록 변형된 것임을 특징으로 하는 형질전환된 미생물.

【청구항 9】

제7항에 있어서, 미생물은 박테리아인 것을 특징으로 하는 형질전환된 미생물.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 상기 박테리아는 대장균인 것을 특징으로 하는 형질전환된 미생물.

【청구항 11】

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항의 형질전환된 미생물을 배양하여 목적단백질을 세포표면에 발현하는 단계 및 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 발현방법.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 목적단백질은 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소저해제, 신호전달 단백질 혹은 그 일부분, 항체 혹은 그 일부분, 단쇄항체, 결합단백질, 결합도메인, 펩타이드, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절 인자, 혈액응고 인자 및 식물 생체방어 유도 단백질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 효소는 리파제인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제12항의 방법에 의해 제조되고, 효소활성을 갖는 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 이용하는 것을 특징으로 하는 생물전환 방법.

【청구항 15】

제12항의 방법에 의해 제조되고, 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 기질 표면에 고정화시키는 것을 특징으로 하는 단백질 어레이의 제조방법.

【청구항 16】

제12항의 방법에 의해 제조되고, 항원이 표면에 발현된 세포를 인간을 제외한 척추동물,에 투여하여 면역반응을 유도하고, 상기 면역반응에 의해 생성된 항체를 회수하는 것을 특징으로 하는 척추동물에서 항체를 제조하는 방법.

【청구항 17】

리파제를 이용하여 라세미 에스터 화합물로부터 키랄성 에스터, 키랄성 유기산 또는 키랄성 알코올로 광학분할하는 키랄 화합물의 제조방법에 있어서, 제13항의 방법에 의해 제조된

세포표면에 발현된 리파제를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 18】

하기의 단계를 포함하는 목적단백질의 개량방법:

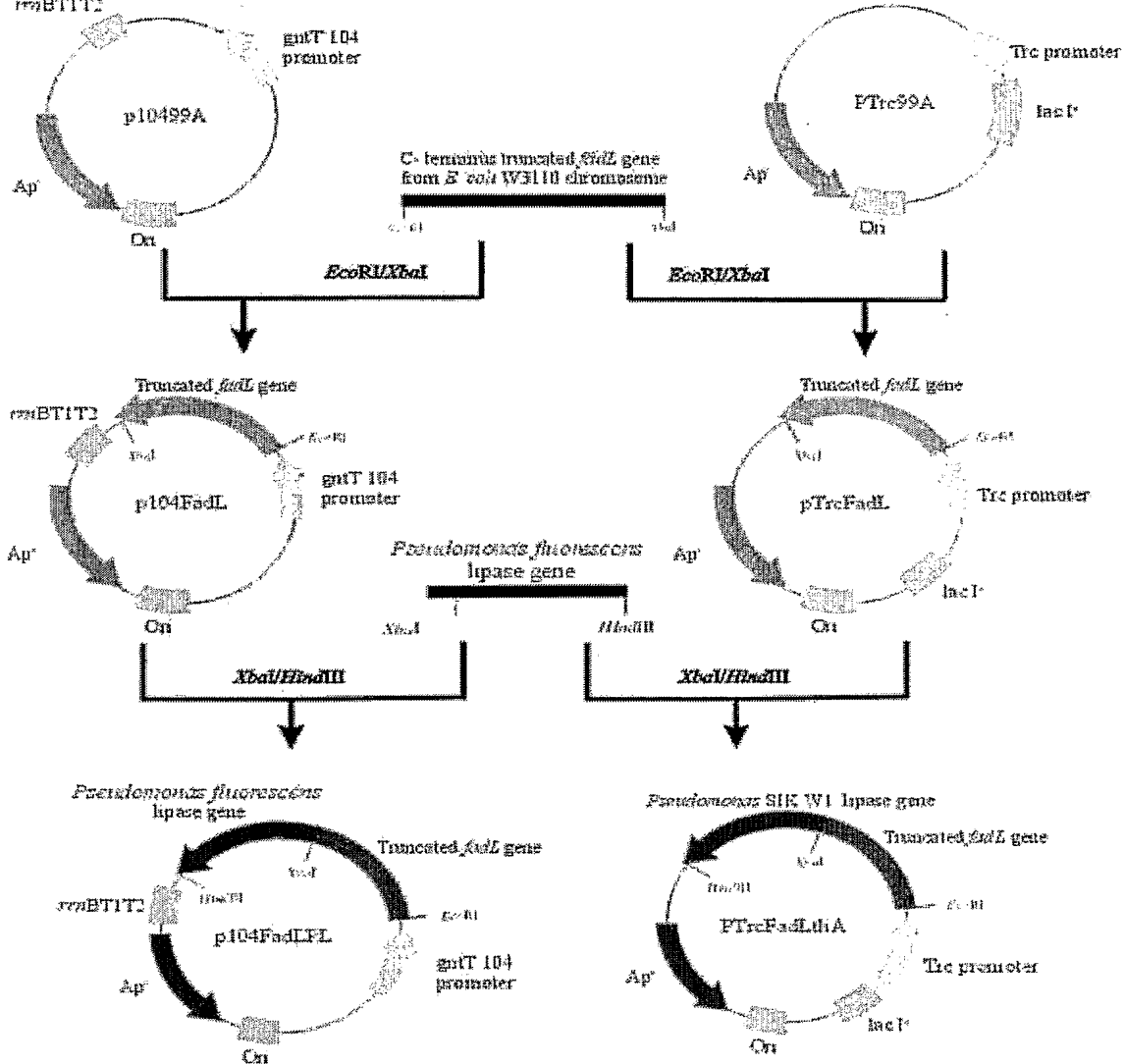
- (a) 목적단백질을 코딩하는 유전자의 변이체 라이브러리를 구축하는 단계;
- (b) 상기 목적단백질의 변이체가 FadL단백질과 융합된 상태로 발현되도록 목적단백질의 유전자 변이체 라이브러리와 fadL유전자를 함유하는 유전자 재조합체를 제작하는 단계;
- (c) 상기 유전자 재조합체 또는 상기 유전자 재조합체를 포함하는 벡터로 그람음성균, 그람양성균, 방선균, 효모 및 곰팡이로 구성된 그룹으로부터 선택되는 숙주세포를 형질전환하는 단계;
- (d) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기 유전자 변이체 라이브러리를 세포표면에 발현하는 단계; 및
- (e) 개량된 형질을 갖는 목적단백질이 발현된 세포를 스크리닝하는 단계.

【청구항 19】

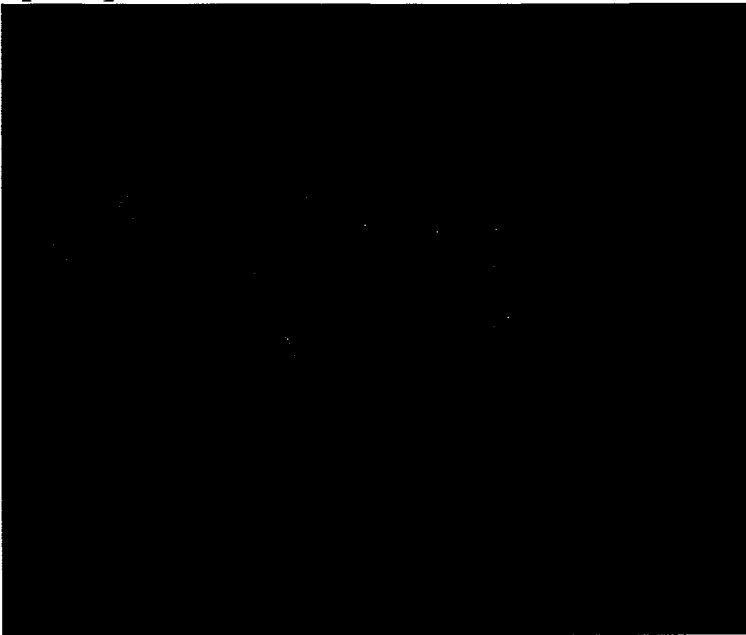
제18항에 있어서, 상기 스크리닝 단계는 목적단백질의 활성화, 목적단백질에 라벨링된 물질을 인식하는 단백질, 목적단백질에 결합하는 라벨링된 리간드 또는 목적단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 개량방법.

【도면】

【도 1】



【도 2】



【도 3】



10 044881

출력 일자: 2004/9/6

【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

